synevo

# Akademia wiedzy Synevo zaprasza na szkolenie online

Szkolenie online organizowane
we współpracy z:






synevo

# Laboratoryjne rozpoznawanie toksoplazmozy: schematy diagnostyczne i interpretacja wyników badań






**Dr hab. n. med. Elżbieta Gołąb**

Kierownik Zakładu Parazytologii
i Chorób Przenoszonych przez Wektory
Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego - PZH

Odpowiedzi na czacie udziela:

**Dr n. med. Iwona Kozak-Michałowska**

Dyrektor Ds. Nauki i Rozwoju Synevo Sp. z o.o.

**Warszawa, 6 grudnia 2018 r.**

# Szkolenie poprowadzi:




**Prof. dr hab. med. Elżbieta Gołąb**

Kierownik Zakładu Parazytologii i Chorób Przenoszonych przez Wektory
Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego - PZH

Elżbieta Gołąb, doktor habilitowany nauk medycznych, lekarz weterynarii, specjalista laboratoryjnej parazytologii medycznej. Jest profesorem Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego - PZH, gdzie pełni funkcję kierownika Zakładu Parazytologii i Chorób Przenoszonych przez Wektory i działającego w jego ramach akredytowanego laboratorium diagnostycznego.
Od wielu lat zajmuje się opracowywaniem i wdrażaniem nowoczesnych metod do diagnostyki laboratoryjnej chorób pasożytniczych, jest autorem/współautorem licznych publikacji oraz patentu z tego zakresu. Jako pierwsza w kraju zastosowała metodę PCR do wykrywania DNA Toxoplasma gondii udoskonalając metodykę laboratoryjnego rozpoznawania inwazji wrodzonych in utero oraz inwazji ośrodkowego układu nerwowego u osób z dysfunkcjami układu immunologicznego. Była członkiem Zespołu Ekspertów, który opracował, skierowane do lekarzy, rekomendacje postępowania w zarażeniu toksoplazmozowym.

# Laboratoryjne rozpoznawanie toksoplazmozy: schematy diagnostyczne i interpretacja wyników badań

**Dr hab. n med. Elżbieta Gołąb**
Kierownik Zakładu Parazytologii i Chorób Przenoszonych przez Wektory
Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego - PZH

Warszawa, 6 grudnia 2018 r.

# TOKSOPLAZMOZA

- jedna z najczęstszych odzwierzęcych chorób pasożytniczych
- występuje u 1/3 światowej populacji ludzi
- czynnikiem etiologicznym jest pierwotniak *Toxoplasma gondii*

**Polska**
**do 60% osób zarażonych**



# PROBLEM BIEDNYCH I BOGATYCH

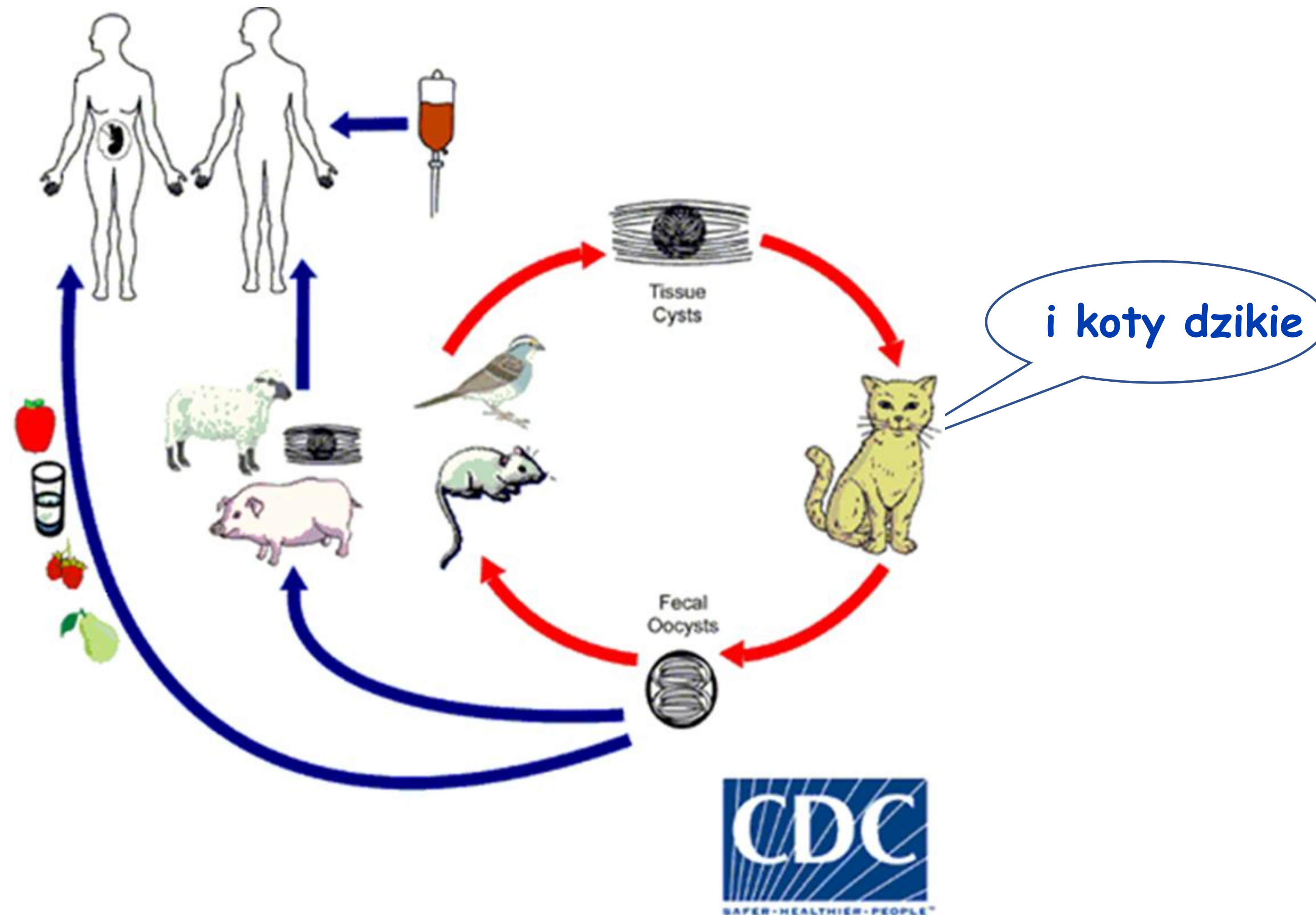
- Toksoplazmoza zagraża życiu osób z przeszczepionymi narządami, chorych poddawanych immunoterapii, zarażonych HIV

- 2300 osobolat utraconych rocznie z powodu przedwczesnej śmierci i utraconych lat życia w zdrowiu z powodu niepełnosprawności to obciążenie toksoplazmozą wrodzoną populacji Holandii - wskaźnik DALY

(Kortbeek i wsp., 2009)



# Transmisja toksoplazmozy



# Transmisja toxoplasma gondii

| Forma rozwojowa | Droga zarażenia |
| --- | --- |
| **Tachyzoit**<br>**2 x 7µm** | Wertykalna, transfuzja krwi, transplantacja organów |
| **Cysta tkankowa**<br>**do 200 µm** | pokarmowa, transplantacja organów |
| **Oocysta**<br>**10 X 12 µm** | pokarmowa |

# Toxoplasma, kot i człowiek

- kontakt z kotem nie stanowi istotnego czynnika ryzyka zarażenia *T. gondii*
- oocysty stają się zakaźne po kilku dniach od wydalenia do środowiska
- nie każdy kot jest zarażony
- zarażony kot wydala oocysty  w ograniczonym czasie



# Środowisko źródłem Toxoplasma

- Środowisko zanieczyszczone oocystami stanowi źródło pasożyta dla człowieka bezpośrednio i pośrednio
- *T. gondii* znajduje się na II miejscu listy czynników etiologicznych zakażeń pokarmowych FAO / WHO

**Zarażone zwierzęta**



4% - 75%



0,4% - 93%



7% - 95%



1% - 92%

# ŻYWNOŚĆ ŹRÓDŁEM ZARAŻENIA

Lozanna, Bruksela, Kopenhaga, Oslo, Neapol, Mediolan

- Spożywanie surowego, niedogotowanego lub wędzonego mięsa powodowało 30-60% przypadków zarażeń:
  - wołowina, jagnięcina lub ,,inne mięso'', próbowanie mięsa podczas gotowania
  - spożywanie salami: 10-14% przypadków zarażeń w Neapolu, Mediolanie, Brukseli

**Sources of Toxoplasma infection in pregnant women: European multicentre case-control study**
*A JC Cook et al. BMJ 2000,321:142-7*

# ŻYWNOŚĆ ŹRÓDŁEM ZARAŻENIA

- *Toxoplasma gondii* może przetrwać enzymatyczny proces wytwarzania sera z mleka koziego

*Dubey J.P. et al. , J. Food Protect. 2014, 77, 1747-17*

- 14% przypadków zarażenia *T. gondii* było z dużym prawdopodobieństwem spowodowane spożywaniem niepasteryzowanego mleka i wytworzonych z niego serów



**Sources of Toxoplasma infection in pregnant women: European multicentre case-control study**
*A JC Cook et al. BMJ 2000,321:142-7*

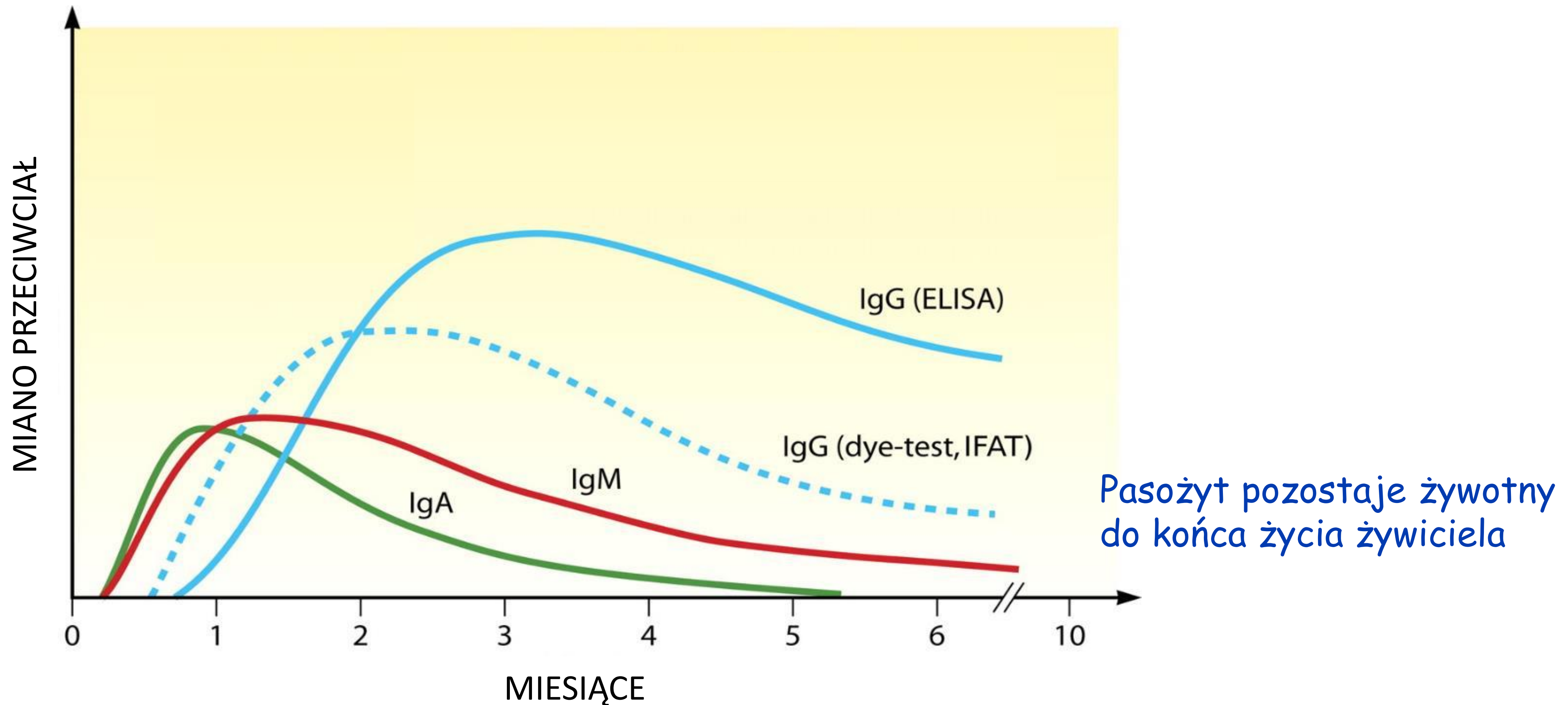
# TOKSOPLAZMOZA

- przebieg najczęściej bezobjawowy lub z objawami grypopodobnymi
- długotrwałe powiększenie węzłów chłonnych szyjnych i potylicznych
- zespół mononukleozopodobny
- zapalenie tylnego odcinka gałki ocznej
- **rozpoznanie w oparciu o  wyniki badań laboratoryjnych**

# Badania laboratoryjne

- Czy pacjent jest zarażony?
- Czy inwazja jest aktywna?
- Kiedy doszło do zarażenia?

# ODPOWIEDŹ IMMUNOLOGICZNA W TOKSOPLAZMOZIE




Pasożyt pozostaje żywotny do końca życia żywiciela

*Robert-Gangneux F., Dardé.ML. 2012, CMR.*

# Osoby immunokompetentne

- **Kogo i kiedy badamy?**
  - kobiety ciężarne lub planujące ciążę
  - pacjenci z zapaleniem tylnego odcinka błony naczyniowej oka
  - dawcy , biorcy w procedurach przeszczepień narządów
  - pacjenci z limfadenopatią w diagnostyce różnicowej z chorobami wirusowymi
  - pacjenci z limfadenopatią w diagnostyce różnicowej nowotworów układu krwionośnego

# Techniki w monitoringu serologicznym

- testy immunoenzymatyczne, aglutynacji immunoadsorbcyjnej, immunochemiczne, z możliwością wykrycia IgG, IgM, IgA (ELISA, ISAGA, ECLIA, ELFA, CMIA)
- rzadziej: immunofuorescencja pośrednia (IgG, IgM)

# Porównanie czułości testów do oznaczania IgG

- **Architect System** (*Abbott Diagnostics Division*)

  *chemiluminescent microparticle immunoassay; CMIA*

| | |
|---|---|
| UJEMNE | 20 |
| DODATNIE | 49 |
| WĄTPLIWIE DODATNIE | 1 |

- Ponowne oznaczenia

| | | |
|---|---|---|
| **IF** | *immunofluorescencja pośrednia* | (test NIZP-PZH) |
| **COBAS** | *elektrochemiluminescencja; ECLIA* | (ROCHE DIAGNOSTICS GMBH) |
| **VIDAS** | *enzymoimmunofluorescencja; ELFA* | (BIOMERIEUX SA) |

# WYNIKI OZNACZEŃ IgG T. GONDII

- Nie stwierdzono rozbieżności wyników testów w oznaczeniach próbek surowic ujemnych

**Próbkę oznaczano jako ujemną:**

- ARCHITECT; IF < 1.6 j.m./ml
- COBAS < 1.0 j.m./ml
- VIDAS < 4.0 j.m. /ml

# WYNIKI ROZBIEŻNE OZNACZEŃ IGG T. GONDII

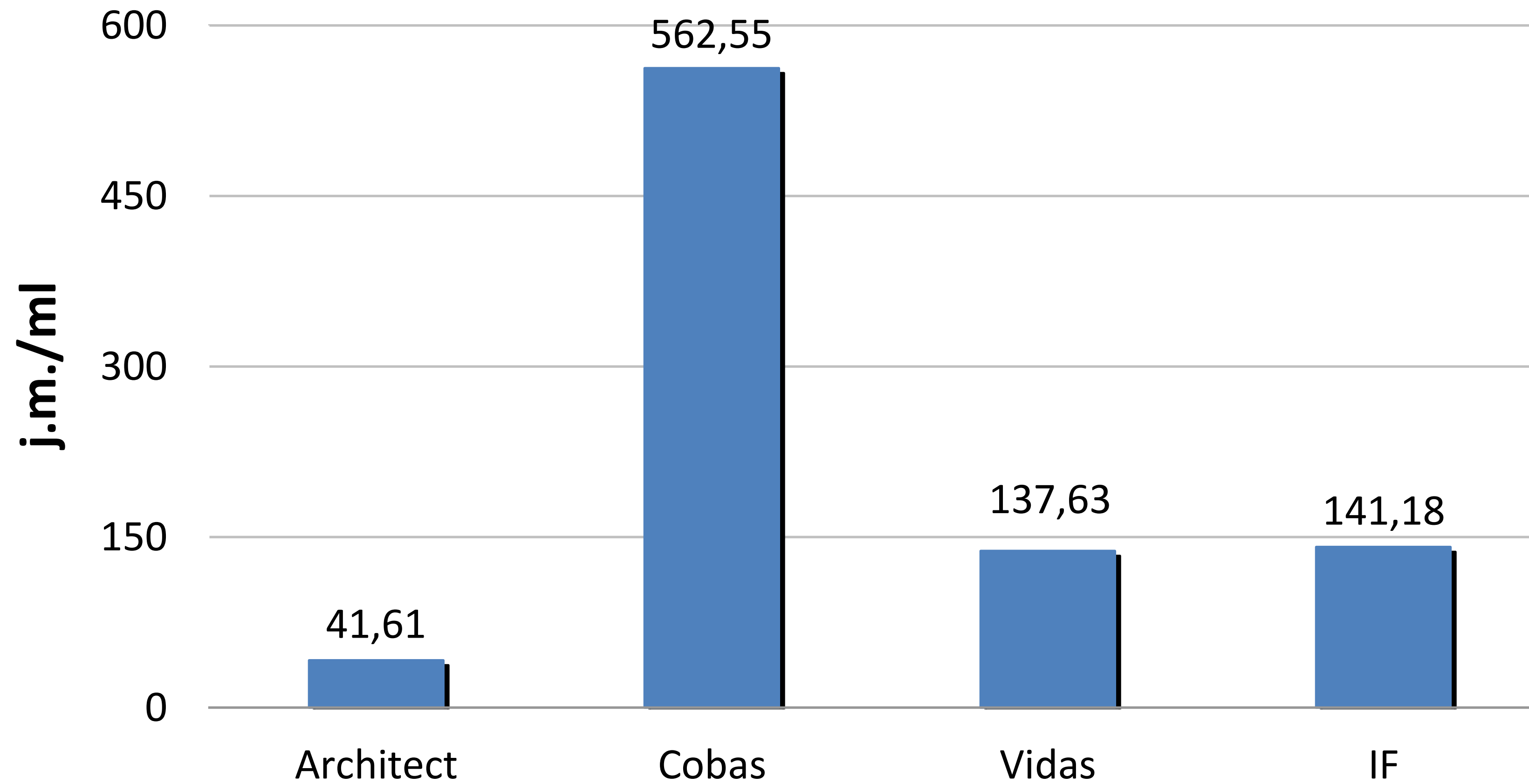
## Wynik niejednoznaczny / wątpliwy

| | | |
|---|---|---|
| **ARCHITECT** | 2,4 j.m./ml | [1,6 > wątpliwy < 3,0 j.m./ml] |
| **VIDAS** | 4,0 j.m./ml | [4,0 ≥ wątpliwy < 8,0 j.m./ml] |

## Wynik dodatni

| | | |
|---|---|---|
| **COBAS** | 60,2 j.m./ml | [1,0 ≥ wątpliwy < 3,0 j.m./ml] |
| **IF** | 12,0 j.m. /ml | [≤1,6 wątpliwy < 4,0 j.m./ml] |

# Średnie wartości stężenia IgG w próbach dodatnich



# Przypadek N.I., 24 lata, ciąża I, 8 tyg.

*Ślepota OL w przebiegu toksoplazmozy wrodzonej w 2 r.ż.*
*Pacjentka obawia się o OP i o możliwość zarażenia płodu*

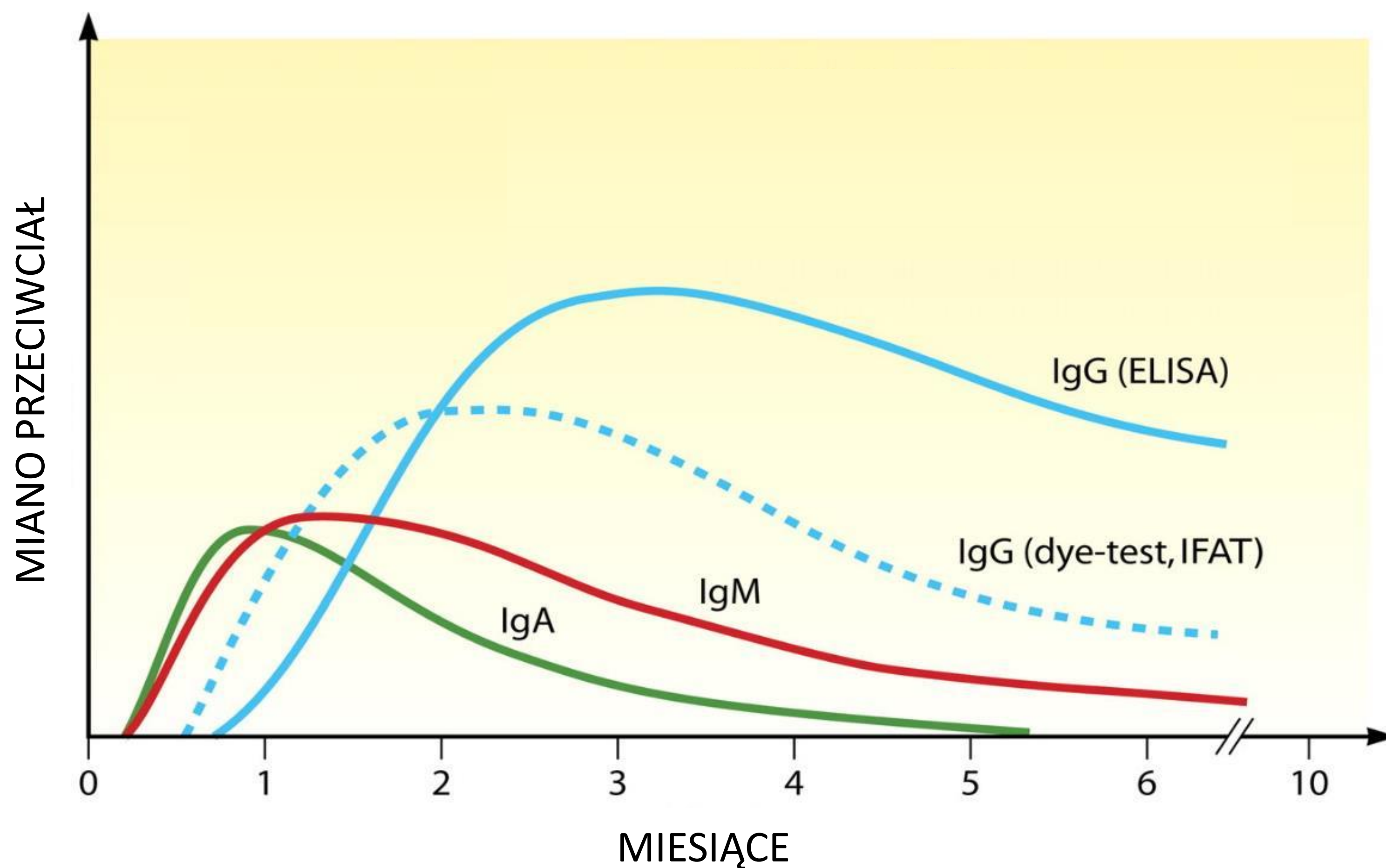
| DATA | WYNIK BADANIA | | |
|---|---|---|---|
| | IgG | IgM | TEST ELISA |
| 06.12.2011 | UJEMNY (0,9 IU/ml) | UJEMNY (Index 0,040) | X |
| 01.02.2012 | DODATNI (13 IU/ml) | nb | Y |
| 30.03.2012 | UJEMNY (0,8 IU/ml) | UJEMNY (Index 0,070) | X |

**KONSULTACJA OKULISTY**
*Obraz jak po przebytej toksoplazmozie ocznej*

**WYNIKI ARCHIWALNE – DODATNIE**
*1991 r. – IF 83 IU/ml*
*1993 r. - Odczyn Sabina - Feldmana 1:200*

**Konsultował: dr. med. specjalista chorób zakaźnych G. Karczewski**

# KINETYKA ODPOWIEDZI IMMUNOLOGICZNEJ




wykrywane po zarażeniu
– powyżej 1 roku
– do 9 miesiąca
--- przez całe życie

*Robert-Gangneux F., Dardé.ML. 2012, CMR.*

# Interpretacja wyników IgG

- Serokonwersja - potwierdza nabycie zarażenia
  - u ciężarnych wskazuje na aktywne zarażenie jeżeli dwie próbki pobrano w trakcie ciąży
- Znaczący wzrost miana przeciwciał w próbkach pobranych w odstępie 3 tygodni - oznaka ostrej fazy zarażenia
- Rosnące miano przeciwciał - zarażenie w okresie krótszym niż 2 miesiące przed pobraniem poprzedniej próbki
- Leczenie toksoplazmozy redukuje lub hamuje wzrost swoistych IgG

# INTERPRETACJA WYNIKÓW IGG

Ważne!

- Możemy porównać wyniki badań kolejnych próbek gdy wykonano je tym samym testem
- Porównujemy stężenie przeciwciał w 1 ml surowicy wyrażone w jednostkach międzynarodowych
- U dawców/biorców organów niskie miano IgG, z zakresu „szarej strefy", zawsze należy potwierdzić testem o wyższej czułości i swoistości

# Jak określić fazę zarażenia ?

Testy nowej generacji wykrywają IgM i IgA przez wiele miesięcy

**IgM**

powyżej 1 roku od zarażenia
( 75 % zbadanych)

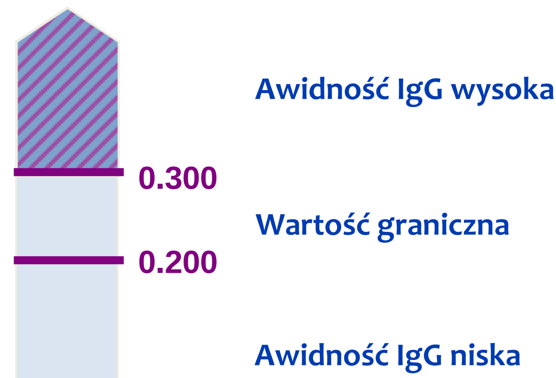
**IgA**

do 9 miesięcy od zarażenia

# OZNACZENIE AWIDNOŚCI PRZECIWCIAŁ IGG

Awidność przeciwciał IgG = Siła wiązania antygenu *T. gondii* **wzrasta wraz z czasem trwania inwazji**

- **Indeks awidności - odsetek przeciwciał o niskiej sile wiązania w puli swoistych przeciwciał wykrytych w próbce**



# TESTY OKREŚLAJĄCE AWIDNOŚĆ IgG

- Typu ELISA – z różnymi antygenami *T. gondii*
- Western-blot
  - użyteczny przy badaniu awidności u pacjentów z niskim mianem IgG
  - umożliwia określenie awidności przeciwciał IgG na podstawie reakcji z antygenami T. gondii występującymi we wczesnej i późnej fazie zarażenia

# AWIDNOŚĆ PRZECIWCIAŁ IGG - INTERPRETACJA

- **Indeks awidności wysoki**
  zrażenie trwa powyżej 4 miesięcy od daty pobrania próbki
- **Indeks pośredni lub niski**
  nie pozwala na pewne określenie czasu jaki minął od zarażenia
- **Leczenie** opóźnia dojrzewanie przeciwciał - przetrwała niska awidność,

# Wewnątrzmaciczne zarażenie Toxoplasma gondii

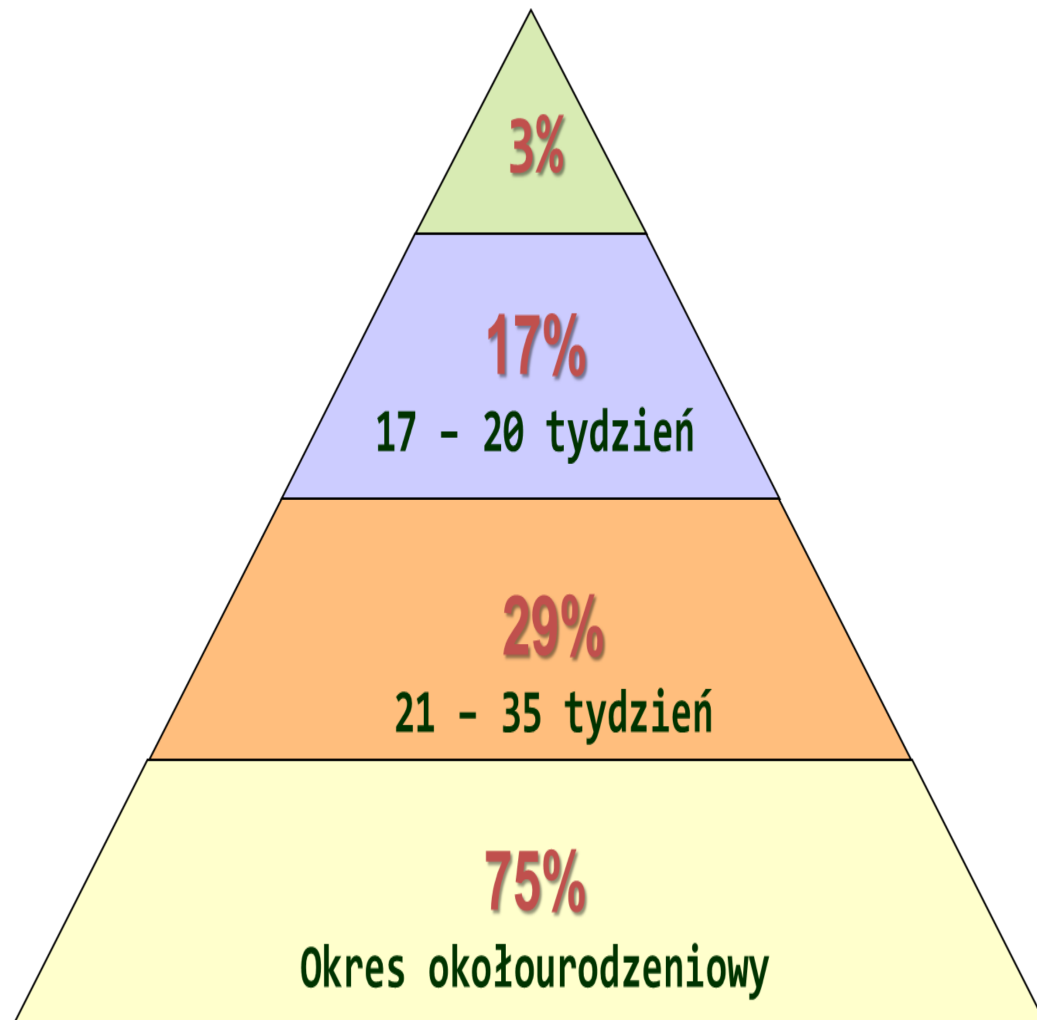
- pierwotne zarażenie kobiety ciężarnej
- reaktywacja inwazji, zwykle u kobiet z immunosupresją
- ponowne zarażenie w ciąży szczepem *T. gondii* o wysokiej wirulencji

# Szczepy Toxoplasma gondii

- USA i Europa – głównie szczepy typu I, II, III

  – zarażenia ludzi najczęściej powoduje szczep typu II
- Ameryka Południowa – często występują szczepy nietypowe
- Szczepy nietypowe o wysokiej wirulencji

  przełamują odporność śródzakaźną




**Skutki toksoplazmozy wrodzonej**

- *poronienie, zgon wewnątrzmaciczny*
- *poród przedwczesny*
- *zahamowanie wzrastania wewnątrzmacicznego*
- *wodogłowie, małogłowie,*
- *zapalenie mózgu*
- *hepatomegalia*
- *splenomegalia*
- *ślepota*
- *zapalenie siatkówki, naczyniówki*
- *zwapnienia śródczaszkowe*

Zarażenia w okresie okołourodzeniowym są zwykle bezobjawowe przy urodzeniu

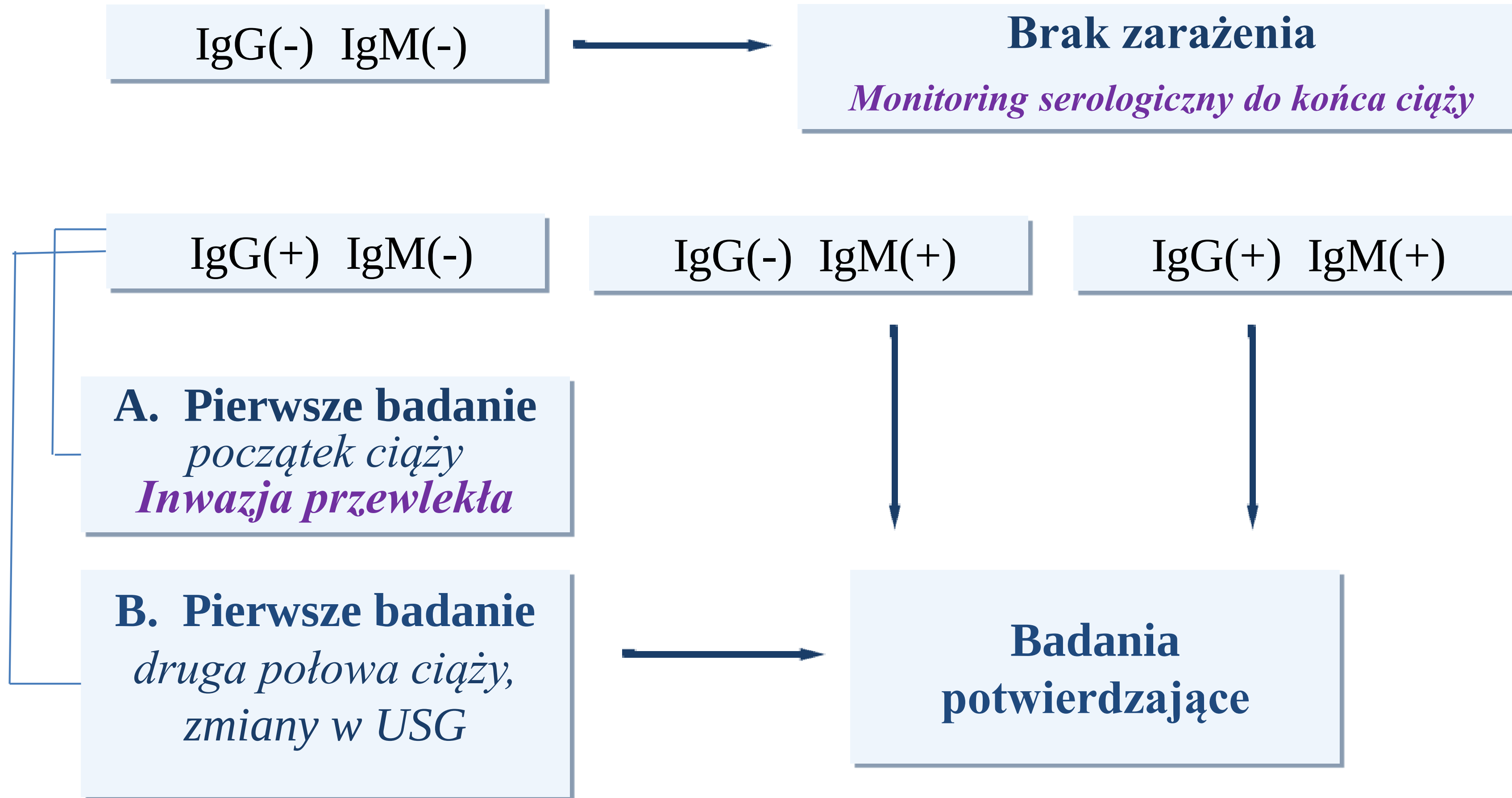
# Badania serologiczne kobiet ciężarnych

- jak najwcześniej w ciąży, wskazane badania przy planowaniu ciąży
- u kobiet seronegatywnych monitoring serologiczny do końca ciąży
- badania przynajmniej trzykrotne :

początek ciąży, około 24 tyg., 2 tyg. przed terminem porodu

*Proponowane postępowanie w zarażeniu Toxoplasma gondii u ciężarnych i ich dzieci*
*Przegląd Epidemiologiczny 2015, 69(2): 403 - 410*

# INTERPRETACJA WYNIKÓW BADAŃ U KOBIET CIĘŻARNYCH



# Ciąża - Interpretacja wyników badań serologicznych

## I TRYMESTR

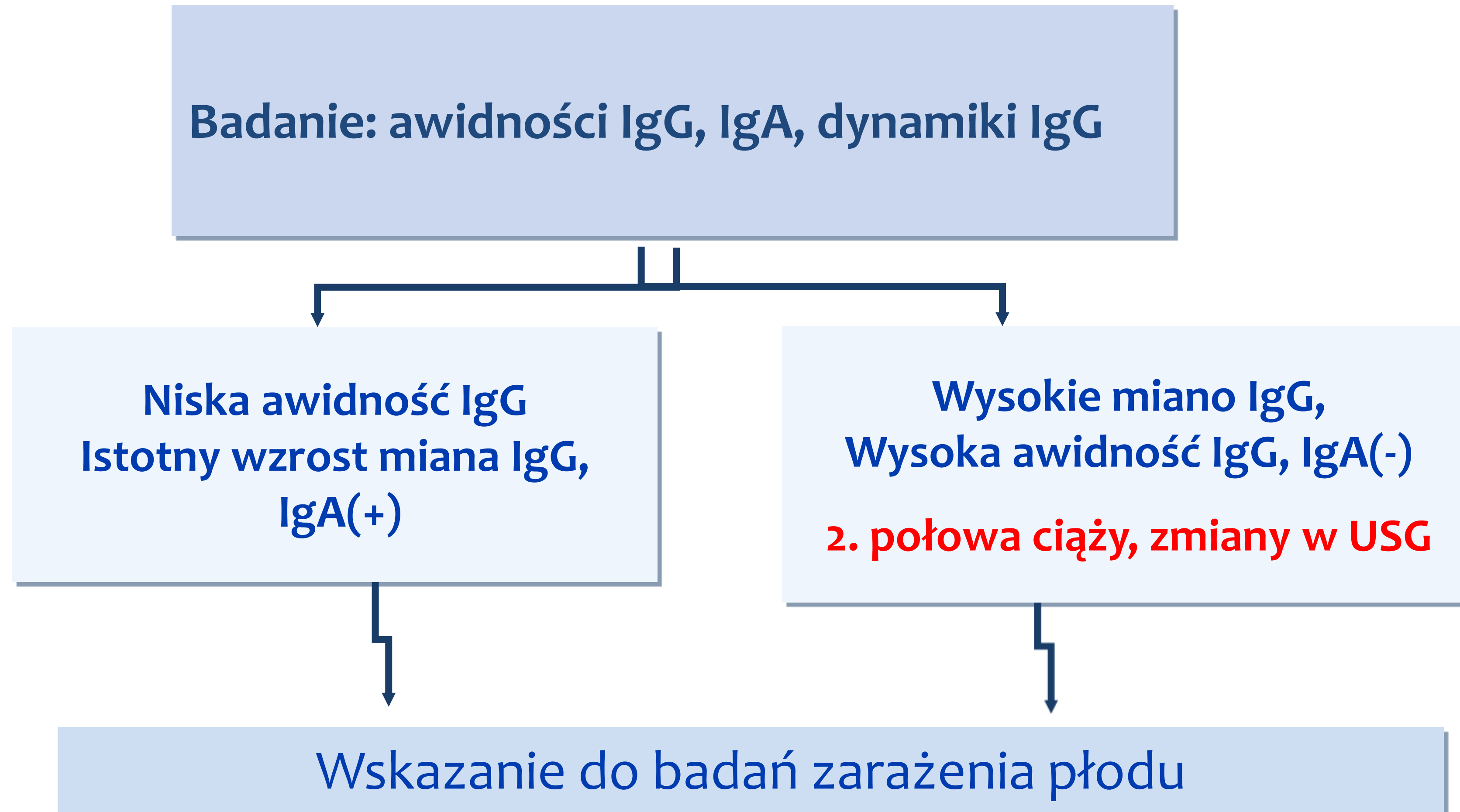
IgG (+) IgM (+) - zarażenie w fazie ostrej ?

- badanie awidności IgG - indeks awidności IgG wysoki
- Czas trwania > 4 tygodni od pobrania próbki

# Ciąża - Interpretacja wyników badań serologicznych

- **We wczesnym okresie ciąży** zastosowanie badania awidności IgG u kobiet z dodatnim IgM pozwala wyeliminować przypadki zarażeń nabytych przed ciążą
- Kluczowa jest uważna interpretacja wyników

# SEROLOGICZNE WSKAŹNIKI ZARAŻENIA NABYTEGO W TRAKCIE CIĄŻY



# Badania Potwierdzające ostrą fazę zarażenia

- Wykrycie pasożyta lub jego DNA w materiale klinicznym
  - Próba biologiczna, mikroskop – wykrywanie pasożyta
  - Badania molekularne - wykrywanie DNA *T. gondii*

- Materiał do badań
  - Toksoplazmoza wrodzona – płyn owodniowy
  - Toksoplazmoza mózgowa – płyn mózgowo- rdzeniowy
  - Toksoplazmoza oczna – płyn z gałki ocznej

# BADANIA MOLEKULARNE
# W CELU POTWIERDZENIA ZARAŻENIA PŁODU

materiał do badań - płyn owodniowy
metoda- konwencjonalny PCR, real-time PCR
amplifikacja sekwencji DNA T. gondii rep - 529

- Wysoka wartość diagnostyczna
- Wynik dodatni - potwierdza zarażenie płodu, czułość powyżej 95%
- Ujemna wartość predykcyjna PCR wynosi około 100% - przy zarażeniu w trymestrze I i II

# Diagnostyka noworodków

**Testy ELISA, ISAGA na obecność IgA, IgM w surowicy dziecka**

Testy przeznaczone do badań noworodków

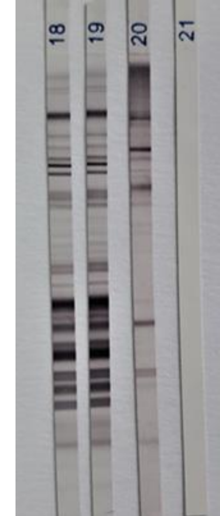
- możliwość zanieczyszczenia próbki przeciwciałami matczynymi
- czułość badania nie przekracza 65% dla IgA i 70% dla IgM
- możliwość potwierdzenia głównie przy zarażeniu nabytym w III trymestrze ciąży

# Diagnostyka noworodków

- Analiza porównawcza IgG i IgM matki  dziecka
- Obecność różnych wzorów przeciwciał / precypitacji u matki i dziecka może potwierdzić zarażenie wrodzone

**Testy**

- Western-blot – porównanie wzorów prążków
    - ELIFA – porównanie wzorów precypitacji




Wynik ujemny WB

# Diagnostyka niemowląt z podejrzeniem wewnątrzmacicznego zarażenia Toxoplasma gondii

- U dzieci bez objawów zarażenia przy urodzeniu mogą pojawić się odległe następstwa (częstość 7% – 15%)
- Serologiczne wykładniki ostrego zarażenia u matki
  - brak badania płynu owodniowego lub ujemny wynik PCR
- **Monitoring przeciwciał IgG do 1 roku życia**
  - badanie wykonywane jest co 2-3 miesiące
  - matczyne IgG zanikają zwykle po 5 – 8 miesiącach

# Toksoplazmoza oczna

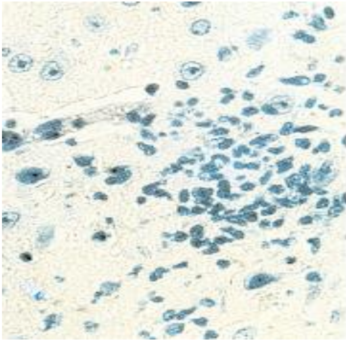
- wynik inwazji wrodzonej, nabytej, reaktywacji w immunosupresji
- ogniska zapalne w tylnym biegunie gałki ocznej kremowo-biała zmiana, po ustąpieniu pozostaje blizna
- ograniczenie widzenia, utrata widzenia, najczęściej dotyczy jednego oka

# TOKSOPLAZMOZA OCZNA

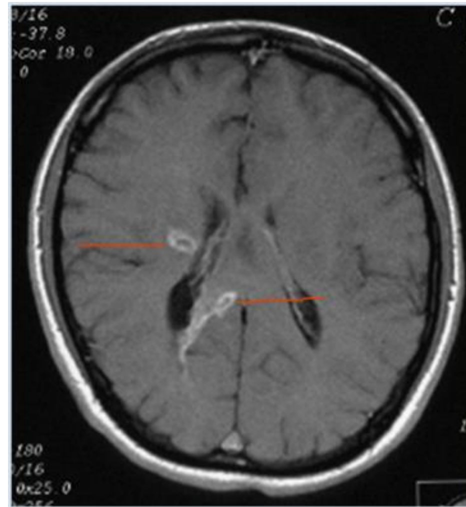
- Badania laboratoryjne mają niską wartość diagnostyczną
  - potwierdzenie zarażenia dodatnim wynikiem IgG
    *nie występuje korelacja pomiędzy stężeniem swoistych przeciwciał w surowicy a aktywnością stanu zapalnego*
- Badanie płynu z przedniej komory oka: Western-blot, PCR
  - Western-blot dla pary próbek: płyn z + surowica
    czułość 50% - 80%; swoistość > 95%
  - badanie Western-blot + PCR czułość do 83%-85%

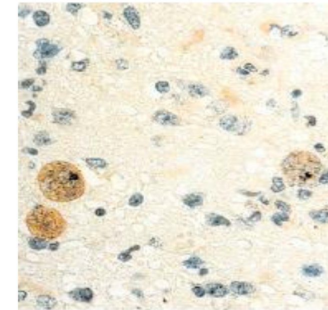
# TOKSOPLAZMOZA
# W NIEDOBORACH ODPORNOŚCI

- Ciężki klinicznie przebieg z zajęciem wielu narządów
- Toksoplazmoza OUN: „ropień mózgu"



Guzek mikrogejowy w korze mózgowej
Barwienie hematoksyliną Meyera





Cysty *Toxoplasma* w mózgu
Barwienie metodą preoksydaza-antyperoksydaza

# BADANIA SEROLOGICZNE W IMMUNOSUPRESJI

- Testy o wysokiej czułości
- Potwierdzenie zarażenia na podstawie dodatniego wyniku przy obecności objawów klinicznych
- Badanie biorców /dawców narządów pozwala na wykluczenie zarażenia przy ujemnym wyniku IgG
- Pomimo objawowej toksoplazmozy wynik IgG jest ujemny przy przeszczepieniach szpiku kostnego
- U niektórych pacjentów HIV + (liczba CD $4^{+} < 200$) podwyższone miano IgG może wskazywać na rozwój zapalenia mózgu

# Podsumowanie

- Interpretacja wyników badań laboratoryjnych jest istotną częścią procesu rozpoznawania przypadków toksoplazmozy

- Badania potwierdzające ostrą fazę zarażenia *Toxoplasma gondii* powinny być wykonywane w laboratoriach referencyjnych, a ich wyniki uważnie interpretowane w odniesieniu do konkretnego przypadku

# Dziękuję za uwagę

Warszawa, 6 grudnia 2018 r.